Aus der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität
Berlin

Direktor: Professor Dr.med., Dr.sc.h.c., Dr.med.vet.h.c.,
Dr.med.h.c. Hans Freiherr von Kreß

ÜBER EINE METHODE ZUR QUANTITATIVEN ERFASSUNG DES LE–ZELLPHÄNOMENS UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG FÖRDERNDER UND HEMMENDER EINFLÜSSE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Brigitte Weigold geb. Fuchs
aus Berlin

1969

Aus der I. Medizinischen Klinik der Freien Universität

Berlin

(Direktor: Professor Dr.med., Dr.sc.h.c., Dr.med.vet.h.c.
Dr.med. h.c. Hans Freiherr von Kreß)

ÜBER EINE METHODE ZUR QUANTITATIVEN ERFASSUNG DES LE-ZELLPHÄNOMENS

unter besonderer Berücksichtigung
fördernder und hemmender Einflüsse

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Brigitte Weigold geb. Fuchs

aus Berlin

Dekan :	Professor Dr. med. Hans Heinz Naumann
Referent :	Professor Dr. med. Meta Alexander
Korreferent :	Professor Dr. med. M. Schwab

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am : 23.6.1969

D i s p o s i t i o n

Seite

I. EINLEITUNG 1

A Lupus Erythematodes als Modell der Autoaggressionskrankheiten 1

B Klinik 2

C Laboratoriumsdiagnostik 3

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN 7

A Spezielle Fragestellung 7

B Methode und Material 10

C Diskussion und Ergebnisse 13

1. Substratgewinnung 13
2. Traumatisierung 14
3. Inkubation 17
4. Das LE-Serum 19
5. Antikoagulantienzusätze 21
6. Darstellung durch Supravitalfluorochromierung 27
7. Einflüsse der Fluochrome und des UV-Lichtes auf das LE-Phänomen . 28

D Schlußfolgerungen 35

III. ZUSAMMENFASSUNG 38

LITERATURVERZEICHNIS 40

I. EINLEITUNG

A Lupus Erythematodes als Modell der Autoaggressionskrankheiten

Seit der Entdeckung des LE-Phänomens 1948 durch HARGRAVES und Mitarbeiter (16) an der Mayo-Klinik wird der viscerale Erythematodes mit 0,33 % aller internen Aufnahmen eines Krankenhauses heute häufiger als z.B. die akute Leukose diagnostiziert (3).
Durch die leichte Reproduzierbarkeit des LE-Phänomens ist der Erythematodes als Musterbeispiel der Autoaggressionskrankheiten in den Mittelpunkt des Interesses klinischer Forschung gerückt. Es konnten durch Auffindung von Autoantikörpern Beziehungen dieser Krankheit zur primär chronischen Polyarthritis, der progressiven Sklerodermie, zur Hashimoto Thyreoiditis, manchen Lebererkrankungen und der Colitis ulcerosa aufgedeckt werden, die weiterer Untersuchungen bedürfen.

Als Ursache des LE-Zellphänomens entdeckte HASERICK 1950 einen antinucleären Serumbestandteil, den sogen. LE-Faktor (18), der in vitro durch Veränderungen an den Nucleoproteiden Quellung und Homogenisierung der Zellkerne weißer Blutkörperchen hervorruft, die nach Ausstoßung aus dem Zellkörper von anderen Leukozyten phagozytiert werden.

Dadurch entstehen die typischen LE-Zellen mit den großen basophilen Einschlußkörpern, den stets dunkler gefärbten, abgeflacht am Rande liegenden Zellkernen, die freien noch nicht phagozytierten Kernkörperchen und LE-Rosetten, bei denen mehrere Leukozyten um einen gequollenen Kernkörper gruppiert sind.

B Klinik

Der LE-Faktorgehalt eines Serums wird in der klinischen Untersuchung durch das LE-Zellphänomen erfaßt.
Das klinisch wechselhafte Bild des Erythematodes mit hohem intermittierenden Fieber, Polyserositis, Polyarthralgien, Endo- und Myocarditis, Nephritis, Lungen- und Gefäßkomplikationen erschwert durch seine Vielfalt die Diagnose (7, 15, 20, 21 u. 41). In den vielen Fällen, die nicht das typische schmetterlingsförmige Erythem des Gesichtes zeigen, und in denen nur einzelne der typischen Symptome vorhanden sind, wird wegen des hohen Fiebers und der stark erhöhten BSG oft an eine Infektionskrankheit gedacht. Wegen der langwierigen Differentialdiagnostik wird viel Zeit für eine wirksame Therapie verloren.

C Laboratoriumsdiagnostik

Deshalb ist die Forderung nach einer schnellen sicheren Routinediagnostik von vielen Forschungsgruppen aufgegriffen worden und eine große Zahl von LE-Testen mit immer wieder abgewandelten Verfahren erschien in den vergangenen zwanzig Jahren in der Literatur (7, 24, 28, 29, 35, 38, 37, 40, 42). Auch vergleichende Untersuchungen über die Brauchbarkeit der Methoden folgten in größeren Zahlen (1, 3, 4, 5, 8, 24, 28), zum Teil mit nur wenig klinischem Material, bedingt durch die Seltenheit der Erkrankung, so daß die Ergebnisse stark variieren. Das lag auch großenteils an der Unzulänglichkeit der klinisch sehr wertvollen Teste für die Forschungsarbeit. Dis bisher verwendete bekannte Ausstrichtechnik der Blutbilder, deren Fehlerquellen für die Klinik tragbar sind, macht die Teste für die LE-Forschung zu ungenau. Schon gewöhnliche Leukozyten werden oft in großen Mengen vom ausstreichenden Glas zerquetscht oder mitgeschleift; in wesentlich stärkerem Maße kann das bei den großen vulnerablen LE-Zellgebilden und Rosetten geschehen. Selbst bei guter Technik sind die vorhandenen LE-Zellen auf einem Objektträger meist zu wenig Material, um genauere vergleichende Untersuchungen zu erlauben.

Ziel dieser Arbeit war es, eine wenig aufwendige Methode zu finden, die quantitative Aussagen über den

LE-Faktor ermöglicht und zugleich zur Untersuchung hemmender und fördernder Einflüsse für die Ausbildung des LE-Phänomens dient.

Anregung dazu kam aus der praktischen Arbeit mit dem fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von LE-Zellen (39), der 1964 veröffentlicht wurde. Dabei wird Venenblut durch Schütteln mit Glasperlen defibriniert und die Zellen traumatisiert, wie es MARMONT für seinen LE-Test beschrieben hat (28). Das geschüttelte Blut überläßt man der Sedimentation für etwa zwei Stunden. In dieser Zeit läuft das LE-Phänomen in vitro ab, wenn genügend LE-Faktor im Blut vorhanden ist. Die oberste Zellschicht wird im Polyaethylenschlauch angesaugt und zentrifugiert. Dicht über der Zellschicht wird der Schlauch durchschnitten, mit einem dünneren Schlauch eine kleine Menge aus dem buffy-coat angesaugt und auf dem Objektträger mit der gleichen Menge 1 : 1ooo verdünnter Akridinorangelösung gut vermischt. Bei der Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop lassen sich durch die Metachromasie des Akridinorange die verschiedenen Zellbestandteile gut voneinander abgrenzen.

Sie leuchten je nach Farbstoffaufnahme in allen Farbtönen von dunkelgrün über hellgrün, orange bis leuchtend rot auf. Durch die große Leuchtkraft des Farbstoffes kann bei der Supravitalfluorochromierung das Präparat dicker in der Schicht sein als bei der Licht-

mikroskopie. Die LE-Zellen können selbst, wenn sie Rosetten bilden, oder in dicken Plaques auftreten, ohne Zellverlust unzerstört beobachtet werden. Außerdem gelingt es, die echten LE-Zellen von allen Pseudo-LE-Zellen sicher zu differenzieren. Dazu gehören die A-, B- und Tartzellen (7, 19, 39) und andere phagozytierte Einschlüsse wie Erythrozyten, Pilze (17), Amyloid (26), auch Heparin (19) und andere großmolekulare Substanzen, wie sie bei den in vitro Blutuntersuchungen vorkommen können. Das wird durch die geringe Farbstoffaufnahme des LE-Einschlußkörpers bedingt, der deshalb in dunkelgrünem Ton scharf abgegrenzt gegen den hellgrünen Zellkern fluoresziert und damit sehr auffällig ist.

Diese Methode sichert eine weitgehend exakte Erfassung sämtlicher gebildeter LE-Zellen eines Leukozytensediments und ist damit Voraussetzung für den Versuch quantitativer Messungen.

Die Ausbeute an LE-Zellen hängt außer von der Aktivität des LE-Faktors auch von dem Verhältnis mechanisch irritierter zu ungeschädigten Granulozyten sowie ihrer räumlichen Distanz zueinander ab. Darüber hinaus wird die Phagozytierfähigkeit der Leukozyten von vielen zum Teil noch unbekannten Faktoren beeinflußt, so daß sich verwertbare Aussagen über fördernde oder hemmende Einflüsse auf das LE-Zellphänomen nur dann machen

lassen, wenn alles Material für eine Versuchsreihe aus derselben Blutentnahme eines möglichst gesunden Spenders gewonnen wird.

Um mit zumutbaren Blutmengen auszukommen, wurde die Marburg-Pipette wegen ihrer Vorteile gegenüber anderen Mikroliterpipetten verwendet. Die geringe Benetzbarkeit ihres Kunststoffaufsatzes und dessen zugespitzte Form gewähren durch den geringen Zellverlust weitgehend Genauigkeit auch für zytologische Mikromethoden.

Die in der Literatur angegebenen Methoden für Gewinnung möglichst vitaler phagozytierfähiger Leukozyten (14, 22, 29, 30, 31, 35, 40), die Traumatisierungsarten, die Bedingungen des Substratansatzes sowie die Darstellungsmethoden der fertigen Präparate wurden verglichen und nach ihrer Brauchbarkeit für die gesuchte Methode ausgewählt. Die Methode selbst wurde an der Untersuchung der Hemmung des LE-Phänomens durch Antikoagulantienzusätze und Fluochrome geprüft.

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A Spezielle Fragestellung

Um eine für die Forschung ausreichend exakte Methode auszuarbeiten, war es unerläßlich, jede einzelne Phase des Versuchsganges im Hinblick auf Reproduzierbarkeit und Ausschluß bekannter und unbekannter Fehlerquellen zu prüfen. Eingehende Untersuchungen galten daher vor allem den fördernden oder hemmenden Einflüssen auf das LE-Phänomen durch die notwendigen Zusätze wie Antikoagulantien, Farbstoffe, Lösungsmittel, Sedimentationsbeschleuniger und LE-Serum.
Die Fragestellung läßt sich im einzelnen wie folgt aufgliedern:

1. Substratgewinnung:

   Welche Methode sichert größtmögliche Zellschonung bei geringer Erythrozytenbeimengung und ist schnell und ergiebig genug, um die Phagozytierfähigkeit zu erhalten und eine ganze Versuchsreihe aus einer einzigen Blutentnahme gesunden Blutes zu ermöglichen. Welche Zusätze sind ohne Einfluß auf das LE-Phänomen?

2. Traumatisierung:

   Die für die LE-Zellbildung erforderliche Irrita-

tion eines Leukozytenanteiles soll so vorgenommen werden, daß sämtliche Zellen ohne Strukturveränderungen absterben. Sie sollen danach zählbar sein, um ein gleichbleibendes Verhältnis vitaler zu avitalen Zellen zu gewährleisten. Die Traumatisierung soll schnell möglich sein, da die vitalen Zellen inzwischen nichts von ihrer Phagozytierfähigkeit einbüßen dürfen.

3. Inkubation:

Alle Einflüsse auf den Ablauf des LE-Phänomens wie Zeit, Temperatur und Zellabstand im Substrat sowie der Zellverlust durch Gefäße und Arbeitsgerät sollten untersucht und diskutiert werden.

4. LE-Serum:

Das jeweils günstigste Verhältnis des LE-Serums zu nicht LE-faktorhaltigem Leukosediment muß nach Stärke des verwendeten Serums und der Zellkonzentration durch Vorversuche herausgefunden werden. Der Einfluß des Serumalters und seiner Aufbewahrung auf die Aktivität sollte untersucht werden.

5. Antikoagulantienzusätze:

Für quantitative Untersuchungen am LE-Phänomen muß das Blut ungerinnbar gemacht werden. Die LE-Zellbildung ist in den Maschen des Fibrinnetzes

zwar möglich, aber nicht erfaßbar. Hier sollten die üblichen Antikoagulantien vergleichend in ihrer Wirkung auf das LE-Phänomen untersucht werden.

Dabei zeigte sich eine Dosisabhängigkeit der Wirkung. An Untersuchungen mit steigenden Konzentrationen von Heparin sollte die Brauchbarkeit der erarbeiteten Versuchsbedingungen geprüft werden.

6. Darstellung der gewonnenen LE-Zellen:

Der Vergleich der bisher geübten Ausstrichtechnik mit der Supravitalfluorochromierung ergab sich schon aus Voruntersuchungen an klinischem Diagnostikmaterial. Durch wiederholte Zählungen sollte der Vorzug der letztgenannten Methode erwiesen werden.

7. Einflüsse der Fluochrome und des UV-Lichtes auf das LE-Phänomen:

Die Möglichkeit einer Fluochrommarkierung der inkubierten Zellen zur Erweiterung der Methode auf quantitativ-qualitative Beobachtungen an der LE-Zellbildung wurde untersucht. Die Frage war, ob der LE-Faktor nur an alterierten Zellen oder an den Phagozyten angreift. Dazu sollten fluochrommarkierte Zellen dem Serum ausgesetzt, gewaschen und anderen Zellen zugesetzt werden.

Eine Verlaufsbeobachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop sollte die LE-Zellbildung weiter klären.

B Methode und Material

3 % Dextran in isotoner Lösung (Hanksche Lösung oder Tyrode Lösung) wird zusammen mit dem Antikoagulans dem Venenblut bei der Abnahme im Verhältnis 1 : 4 zugesetzt und vorsichtig vermischt (Schaum vermeiden). In Zentrifugengläsern läßt man die Mischung bis zur Sedimentation der Erythrozyten im Kühlschrank, was etwa 15' bis 30' in Anspruch nimmt. Das abgesaugte überstehende Plasma wird 7' bei 150 G in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Das nun sehr leukozytenreiche Sediment wird mit der zweifachen Menge des unverdünnten Serums des gleichen Spenders aufgeschwemmt und in luftdicht verschließbare kleine Gefäße umgefüllt. Die Hälfte wird auf Objektträgern ausgestrichen, getrocknet und 30' in trocknem Zustand gelassen. Danach schwemmt man die Trockenzellen mit wenig autologem Serum ab und füllt sie in ein gleiches Gefäß. Günstig sind Polyaethylentöpfchen mit spitzem Boden und Deckel ca. 1 ml Inhalt. Frische und trockene Leukozyten werden in der üblichen Weise in der Zählkammer gezählt. Dann wird in einem dritten Töpfchen eine Mischung hergestellt, die

eine möglichst gleiche Anzahl von frischen und trockenen Zellen enthält. Diese muß für alle gewünschten Ansätze ausreichen. Da es sich um sehr kleine Mengen handelt, erwiesen sich Mikroliterpipetten "Marburg", die ein sehr genaues Arbeiten ermöglichen, als geeignet.

Für die Ansätze wird durch mehrfaches Ansaugen und Austreiben mit der Pipette die Zellsuspension jedesmal wieder gut vermischt. Auf 20 Mikroliter Zellsuspension gibt man jeweils 10 Mikroliter LE-faktorhaltiges Serum, in weiteren 5 Mikroliter Serum wird die Prüfsubstanz gelöst oder im Leerversuch reines Serum zugegeben. Diese gut durchmischte Suspension wird zum Inkubieren in einen PVC-Schlauch (1,5 x 2,1 mm) mit der Pipette eingefüllt, dann wird das untere Ende des Schlauches durch Zuschmelzen oder durch einen festen Knoten verschlossen. Diese Schläuche können im Wasserbad oder an der Luft bei beliebigen Prüfbedingungen zur spontanen Sedimentation aufbewahrt werden.

Nach 90 bis 120' schneidet man den Schlauch dicht über dem Sediment ab und entnimmt mit dem PVC-Schlauch (0,5 x 1,0 mm) durch Ansaugen die Zellsuspension. Diese wird mit einer gleichen Menge einer Akridinorangelösung in isotoner Phophatpufferlösung (1:1ooo verdünnt) auf dem Objektträger vermischt und etwa 3 Mikroliter davon mit einem ganz leicht aufgelegten, gut gereinigten Deckglas bedeckt. Das Präparat ist

dünn genug, wenn die Erythrozyten unbeweglich liegen. Daß sie flach liegen, ist meist nicht möglich, da die LE-Zellen und Rosetten bei dem wesentlich größeren Durchmesser zu stark gequetscht würden. Die Betrachtung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop erst bei kleiner, dann bei großer Vergrößerung mit Ölimmersion. An den verschiedensten Stellen des Präparates werden nun 100 Zellen ausgezählt und dann die gefundenen LE-Zellen in Prozenten der vorhandenen vitalen Leukozyten errechnet.

An Material wurden verwendet:

Liquemin Roche (1 ml Ampullen ohne Phenol, 2 5oo IE/ml)

Bei Blutbanken übliche Dosierung 3-4 IE Heparin/ml Blut

Dextran (Mol.Gewicht 250.ooo)

Akridin orange, gereinigt nach Zanker

Mikroliterpipette "Marburg", Fa. Eppendorf (20 und 5µl)

PVC-Schlauch P 5 = 1,5 x 2,1 mm und
P 2 = 0,5 x 1,0 mm

Fluoreszenzmikroskop der Fa. Zeiß, Typ Photomikroskop

Lampe: Quecksilberhöchstdrucklampe HBO 220 W

Filter: Erregerfilter 363

Sperrfilter 50 (44)

Die Methode kann nach der jeweils gestellten Problematik abgewandelt werden. Anstelle von Heparinzusatz können andere gerinnungshemmende Mittel oder durch Rühren

defibriniertes Blut verwendet werden. Bei der Prüfung von Inhibitoren setzt man diese vor dem LE-faktorhaltigen Serum den Leukozytensubstraten zu.

C Diskussion und Ergebnisse

1. Substratgewinnung

Im Interesse nennenswerter LE-Zellgewinnung kann auf Leukozytenanreicherungen nicht verzichtet werden. Dafür sind die verschiedensten Methoden auch in den LE-Testen angewendet worden. SNAPPER und NATHAN ließen aus Blutstropfen auf Objektträger Leukozyten auswandern (35). WATSON nahm den zellreichen Inhalt von Kantharidenblasen (40). KLIMA zentrifugierte Zitratblut und pipettierte den buffy-coat (22). Van SOEREN (36) empfahl heparinisiertes Blut von Patienten mit hoher Blutsenkungsreaktion (über 80 mm/h), um die langsam senkenden Leukozyten als Schicht über den Erythrozyten absaugen zu können. Diese Gewinnung war ungeeignet, da es hier auf möglichst große Mengen gesunder Zellen ankam, die bei hoher BSR nicht zu erwarten sind.

Günstig schien die Leukozytenanreicherung durch beschleunigte Sedimentation mit Hilfe hochmolekularer Substanzen wie Dextran, Gummiarabicum, Polyvinylpyrrolidin,

Fibrinogen, wie sie auch MINOR und BURNETT (30) angegeben haben. Das Prinzip dieser Methode ist eine Senkungsbeschleunigung der Erythrozyten durch Geldrollenbildung unter dem Einfluß der oben genannten Stoffe. Die so entstandenen größeren Korpuskeln sinken schneller als die solitär suspendierten Leukozyten. Durch Absaugen des überstehenden Serums und schonendes Zentrifugieren oder Sedimentieren gewinnt man hochkonzentrierte weitgehend eryfreie Leukosuspensionen. Im Vergleich mit der Zellgewinnung durch Zentrifugieren und Absaugen erwies sich diese Methode als ergiebiger, schonender und weniger aufwendig. Ihr Nachteil ist der Zusatz der großmolekularen Substanz, deren biologische Wirkung unbekannt ist, wie deren Lösungsmittel. Es wurden daher der Einfluß verschiedener Lösungsmittel auf das LE-Phänomen geprüft und dabei für HANKsche und TYRODE-Lösung (ein Teil auf vier Teile Blut) bis zu 90 % LE-Zellen gefunden. Auch für Dextran in 3 %iger Lösung (1 : 4 mit Blut vermischt) ließen sich keine hemmenden Einflüsse feststellen. Wesentlich ist hierbei das mittlere Mol-Gewicht, da Dextran in sehr unterschiedlicher Mol-Größe angeboten wird, die den Sedimentationseffekt stark beeinflußt.

2. Traumatisierung

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, daß der LE-

Faktor am alterierten Zellmaterial besser auf sein Reaktionssubstrat, den Zellkern, einwirken kann (3, 4, 28, 31, 35). Auch diese Untersuchungen zeigten keine nennenswerte Ausbeute an LE-Zellen bei nichttraumatisierten Leukozyten. Es wurden daher verschiedene Traumatisierungsmethoden im Hinblick auf die Ausbeute und Zählbarkeit der wirklich geschädigten Zellen untersucht, um reproduzierbare Versuchsbedingungen zu schaffen. Verschiedene Arten der Traumatisierung von Leukozyten sind bisher bekannt: Gerinnungsprozesse mit anschließendem Zerreiben des Blutkuchens verwendeten ZIMMER und HARGRAVES (3, 22, 42) und LEE (25) für ihre Teste; damit sollen gute Resultate erzielt werden. Mechanische Lädierung liegt bei der Schüttelmethode mit Glasperlen nach ZINKHAM, CONLEY (43) und MARMONT (28) vor. Auch Waschprozesse wurden untersucht sowie chemische Schädigung durch Quinacrine (9, 24).

Diese bisher genannten Methoden sind ungeeignet, weil nicht meßbar ist, welcher Anteil von Zellen geschädigt wird und welcher vital bleibt. Weitere Maßnahmen sind Trocknung, wie sie im Ringtest von SNAPPER und NATHAN beschrieben ist (35), Einfrieren, eine zur Aufbewahrung von Substratleukozyten gut geeignete Methode, die MOYER (31) und van SOEREN (36) anwendeten, und Alterung, z.B. altes Bankblut (13, 35). Eine gleichmäßige Schädigung aller behandelten Zellen ist dabei sicher. Leukozyten, die getrocknet, eingefroren oder über einen

Tag abgestanden sind, haben ihre Phagozytierfähigkeit verloren. Die Alterung schien ungeeignet, da wir Phagozyten und Substratzellen aus der gleichen Blutentnahme verwenden wollten. Daher wurden kurzzeitiges Einfrieren und Trocknen mit einer weiteren Traumatisierungsmöglichkeit, dem Ultraschall, verglichen. Die Energieverteilung des Ultraschalles erfolgt nicht gleichmäßig, so daß bei einer kurzen Beschallung (30 sek) nicht alle Zellen getroffen werden. Bei längerer und höherer Dosierung gibt es so reichlich Detritus, daß die Zählung in der Zählkammer ungenau und mit zuviel Fehlerquellen belastet wird.

Tabelle I

Art der Traumatisierung:	Resultat:
Ultraschallzellen 30 Sek.	Wenig vollständige Zellen, viel Trümmer, reichlich LE-Zellen und Rosetten
Gefrierzellen 30 Min.	Reichlich LE-Zellen, wenig Rosetten oder freies Kernmaterial
Trockenzellen 30 Min.	Massenhaft LE-Zellen u.Rosetten u.freies Kernmaterial

Die Ergebnisse sprachen für eine kurzzeitige Trocknung. Zur Dauer der Trocknungszeit ergab sich, daß die Zellen nach 30' ihre Phagozytierfähigkeit verloren haben, ohne weitere grobe Destruktionen zu zeigen. Über länge-

re Zeit aufbewahrte Zellen gaben zwar nach Tagen noch mit frischen Phagozyten LE-Zellen, aber in abnehmender Menge, selbst wenn die Aufbewahrung in der Tiefkühltruhe eine bakterielle Schädigung auf das Minimum beschränkte.

Tabelle II

Alter der Zellen	2 Tg.	6 Tg.	9 Tg.	16 Tg.
Resultat an LE-Zellen	30 %	10 %	10 %	Vereinz. LE-Zellen, viele Trümmer

3. Inkubation

Zur Inkubation der Leukozyten mit LE-Serum wurden verschiedene Faktoren untersucht: Temperatureinflüsse, Zeit der Einwirkung, Konzentration des LE-Serums und sein Alter. Die Inkubation erfolgte in durchsichtigen zugeschmolzenen PVC-Schläuchen. Man kann dabei die Senkung der Zellsuspension beobachten, die genügend engen Kontakt bietet, um das LE-Phänomen ablaufen zu lassen. Hinterher ist es leicht möglich, die ganze Zellmenge zu entnehmen, indem man den Schlauch dicht über dem Sediment abschneidet und mit einem schräg ge-

schnittenen Schlauch kleineren Durchmessers leersaugt. Die Schläuche lassen sich auch in der Mikrozentrifuge befestigen, wenn eine beschleunigte Sedimentation gewünscht wird. Vergleiche mit zentrifugiertem und spontan gesenkten Zellmaterial fielen zugunsten des letzteren aus. Der allzu enge Kontakt nach Zentrifugieren behindert anscheinend den Phagozytosevorgang. Die Inkubation in paraffinummantelten Deckglaspräparaten, deren kapillarer Spalt nach Phasenkontrastbeobachtungen besonders günstig für die LE-Zellbildung ist, ergab stark variierende Resultate, vermutlich je nach Schichtdicke, und eine brauchbare Färbung ist uns nicht gelungen. Daher ist sie ungeeignet für quantitative Messungen.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Inkubationszeit. Bei normaler Zimmertemperatur ist nach 90' Inkubation optimale Ausbeute möglich, die auch nach 120' kaum verbessert werden kann. Bei kühler Raumluft dagegen wird der Prozeß erheblich verzögert. Bei Kühlschranktemperaturen (+ 3°) fanden wir kaum LE-Zellen. Dagegen waren zwischen mittlerer Raum- und Körpertemperatur (20°- 37°) keine deutlichen Unterschiede zu registrieren. Schon wenig erhöhte Körpertemperatur (39°) scheint ungünstig zu sein.

Tabelle III

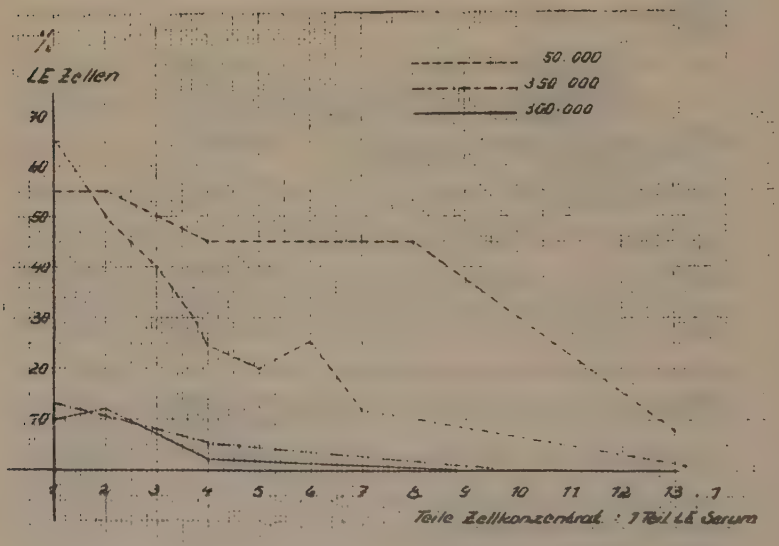
Zeit	30'	60'	90'	120'
Temperatur				
20° C	vereinzelt LE-Zellen viel begonnene Phagozytosen, viele tote Zellen	Bis 10 % Le-Zellen viel freies Kernmaterial	65 % LE-Z. wenig freies Kernmaterial	65 % LE-Z.
30° C	"	"	65 % LE-Z.	65 %
37° C	"	"	65 % LE-Z.	65 %
39° C	"	"	45 % kleine LE-Zellen, gequollene Kerne	45 % LE-Z. mit Vacuolen.

4. Das LE-Serum

Der LE-Faktor reagiert mit dem Nukleoproteid des Zellkerns und wird von freiem Kernmaterial, nicht von unversehrten Zellen - quantitativ meßbar, absorbiert (3). Die optimale Konzentration des LE-Faktors für die LE-Zellbildung war meßbar von der Zellzahl/mm^3 in der Suspension abhängig.

Abb. 1

Verhältnis vom Leukozytensediment und seiner Konzentration zum LE-faktorhaltigen Serum



Zur Konstanterhaltung der Versuchsbedingungen empfiehlt es sich aus diesem Grunde, die gleiche Zellkonzentration wie auch das gleiche Verhältnis von Normalserum zu LE-Serum - und dieses wieder aus der gleichen Blutabnahme - für alle Ansätze zu verwenden.

Das hier verwendete sehr starke Patientenserum ergab auch nach 15 Monaten bei Aufbewahrung in der Tiefkühl-

truhe (-18 bis -20° C) gleichgute Resultate. Nach dem Auftauen wurde es nicht wieder eingefroren, sondern im Kühlschrank bei + 3° C aufbewahrt. Obgleich dabei eine Trübung auftrat, wurden nach zwei Wochen noch hohe LE-Aktivitäten gefunden (15 Monate Tiefkühlung und 2 Wochen aufgetaut!), die zusätzlich durch den Hyland-Latex-Test nachgewiesen wurden.

5. Antikoagulantienzusätze

Eingehende Untersuchungen galten den Vor- und Nachteilen eines Antikoagulantienzusatzes. Die Agglomerationsneigung der weißen Blutzellen im LE-Serum macht eine exakte Auswertung des Materials unmöglich. Schon HASERICK erwähnt 1950 dieses Phänomen (11, 18), wogegen van SOEREN (3, 36) und LEE (25) ihre loose-bodyteste auf der gegenteiligen Behauptung aufbauten. Da sich die Agglomeration auch im Marmontschen Schüttelblut bei klinischen LE-Testen finden ließ, und zwar fast regelmäßig bei LE-positivem Blut, wogegen sie bei den meisten negativen Fällen fehlte - kann sie nicht allein blutgruppenbedingt sein. Es gibt danach ein gegensätzliches Verhalten abgestorbener und vitaler Zellen im LE-Serum; während LEE und van SOEREN abgestorbene Zellen und freies Kernmaterial, das im Normalserum klumpt, durch LE-Serumzusatz in der Agglomeration behinderten, beobachtete man diese bei vitalen Zellen nicht

im Normalserum, aber unter LE-Faktoreinwirkung. Durch Antikoagulantienzusätze läßt sich diese LE-typische Agglomeration weitgehend einschränken. Eine individuelle Schwankungsbreite scheint gegeben. So läßt sich z.B. mit Heparinzusatz bei manchen Präparaten die Verklebung ganz vermeiden, bei anderen kommt es noch zur Bildung von Zellplaques, die sich aber dadurch unterscheiden, daß sich durch die losere Anlagerung auch die Zellen in der Mitte differenzieren lassen, wahrscheinlich bedingt durch eine bessere Farbaufnahme bei der Fluorochromierung.

Bei dem Vergleich chemisch ungerinnbar gemachten Blutes mit durch Rühren defibriniertem läßt sich im auszählbaren Resultat kaum ein Unterschied feststellen. Aber bezogen auf das ganze inkubierte Zellmaterial ist Rührblut wesentlich ungünstiger, denn dabei fällt etwa die Hälfte vitaler Zellen für die LE-Zellbildung aus, weil sie in festgepreßten Klumpen nicht phagozytieren kann. Weiter fällt auf, daß bei Verwendung von EDTA (Tetracemin) als Gerinnungshemmer in der Hälfte der Versuche die Phagozytose wohl begonnen ist, aber die homogenen Einschlüsse noch teilweise außerhalb der LE-Zelle liegen. Man muß also annehmen, daß die vitalen Zellen durch das EDTA nach längerer Einwirkung beschädigt werden.

Tabelle IV

Spender:	We	He	Th	Sch	Mer	Mx	Bemerkungen
Rührblut	75	55	35	20	60	75	% viel Plaques-bildung
EDTA-Blut	55	55	35	25	30	75	viel begonnene Phagozytosen
Citrat-Blut	70	-	35	-	-	-	
Heparin-Blut	70	65	35	25	50	75	

LE-Zellbildung in % der vitalen Leukozyten, berechnet unter dem Einfluß verschiedener Antikoagulantienzusätze in üblicher gerinnungshemmender Dosierung (tote Zellen, freies Kernmaterial und agglomerierte Zellen in Plaques wurden nicht mitgezählt)

Die zytotoxische Wirkung des EDTA ist von LOCHTE und Mitarbeitern (27) nachgewiesen worden, nachdem die Mitteilungen darüber bis dahin sehr verschieden waren. Schon Pflanzenzellmitosen sollten durch EDTA verhindert werden. LOCHTE untersuchte dessen Einfluß auf die Mitosen in Knochenmarkkulturen - durch Messung der

DNS-Synthese mit Isotopen - im Vergleich zum Heparin. Er fand keine Einschränkung des Zellwachstums bei Heparinzusatz in normaler gerinnungshemmender Dosis, die allerdings sehr verschieden gehandhabt wird. Im allgemeinen wird für Blutkonserven etwa 18 mg Heparin pro 500 ml Blut berechnet, was etwa 3 bis 4 I.E. pro ml entspricht.
Bis 1 mg/ml fand LOCHTE Heparin unschädlich. Dies betrifft nur phenolfreie Präparate, da Phenol schon in Konzentrationen über 0,1 mg/Ml die Mitosen sehr stark hemmte.
Bis auf die Hälfte fand LOCHTE die DNS-Synthese herabgesetzt bei der halben üblichen Konzentration von EDTA (0,5 mg/ml).

Danach und nach den obigen Untersuchungen muß EDTA als ungeeignet bezeichnet werden. Um eine genauere Definition der Unschädlichkeit des Heparins zu geben, wurde mit steigenden Konzentrationen von phenolfreiem Heparin untersucht. Im praktischen Klinikbetrieb wird bei der Routineblutentnahme nur schwer eine genaue Dosierung des Heparins erreicht. Meist wird beim bloßen Benetzen der Spritze schon das Vielfache der notwendigen Heparinmenge gebraucht. Man kann auch mit wesentlich weniger als der oben angegebenen Dosis eine Gerinnung verhindern. Es ließ sich zeigen, daß die Heparin-Toleranz der Leukozyten je nach Spender verschieden ist, daß aber bei höheren Konzentratio-

nen ein deutlicher Abfall der LE-Zellausbeute auftritt. Bis zur 8fachen gerinnungshemmenden Dosis (ausgehend von 3-4 I.E./ml) erhält man noch recht gute Resultate. Darüber muß von einer Hemmung des LE-Phänomens gesprochen werden.

Abb. 2

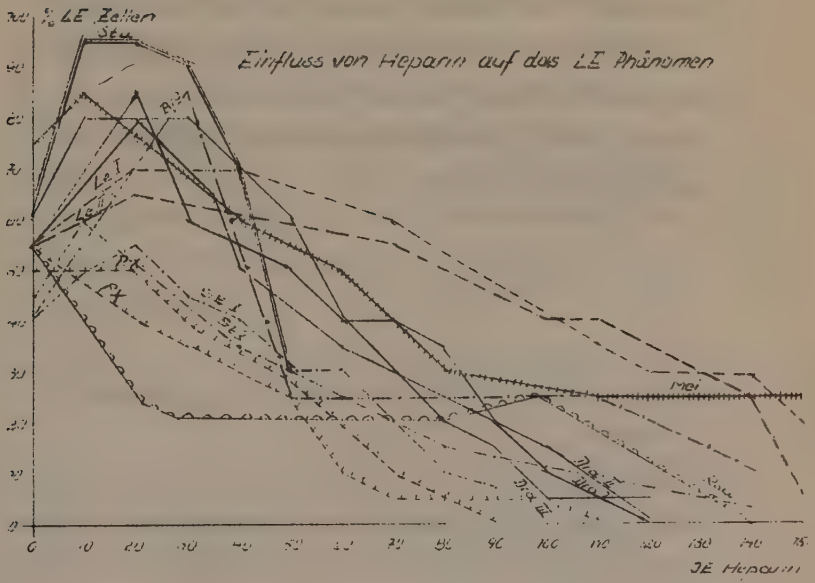
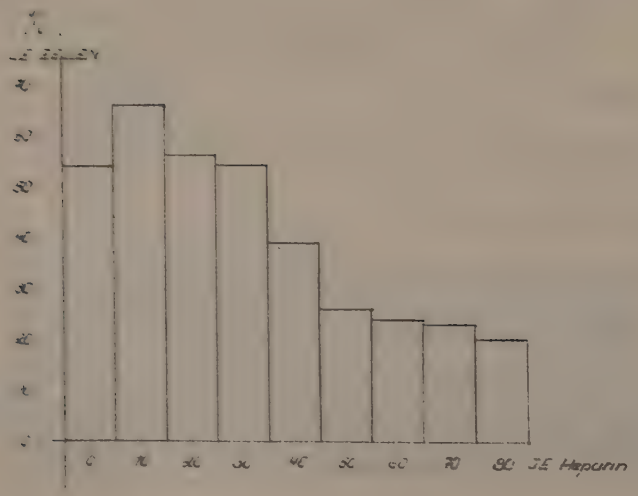


Abb. 2 zeigt eine starke Kurvenstreuung, daher wird in Abb. 3 zur besseren Anschaulichkeit der Mittelwert der Messungen in Kolumnen dargestellt. Dabei zeigt sich zunächst ein Anstieg unter kleinen Heparindosen gegenüber dem Leerwert, dann ein Abfall.

Die Kurvenstreuung in Abb. 2 kann einmal durch mangelnde Präzision der Methode, zum anderen durch die individuelle Verschiedenheit im Ablauf des LE--Phänomens bedingt sein. Über die Einheitlichkeit des LE-Faktors bestehen noch sehr verschiedene Ansichten. Neben Anti-DNS-Faktoren sind antizytoplasmatische und "phagozytosis-promoting" Faktoren angenommen worden (3). Sicher wird darüber hinaus die Phagozytosefähigkeit der Leukozyten auch von LE-unspezifischen Faktoren beeinflußt, so daß man nicht erwarten kann, daß die Reaktionen gleichlaufen. Dafür spricht auch die Gleichheit der Kurven, wenn in mehreren Versuchsreihen Zellen vom selben Spender verwendet wurden.

Abb. 3



Manche Autoren berichten von besonders "schönen" Zellen bei Verwendung von Heparin (4, 29). Es fällt auf, daß die homogenen Einschlüsse größer sind, die LE-Zelle dadurch besonders prall gefüllt erscheint und die Kerne ganz flach an den Rand gepreßt sind. Hier vergleicht man am besten die freien Kernkörper, die auch stärker gequollen sind, mit den vitalen Leukozyten. Während sie sonst allenfalls gleich groß gefunden werden, sind sie unter Heparin wesentlich größer. Möglicherweise steht dies in Zusammenhang mit der von STÖTTGEN beobachteten Proteolyse im Serum unter Heparinzusatz (38). Dieser Quellungseffekt läßt sich auch bei der Supravitalfluorochromierung besser beurteilen als im Lichtmikroskop, da die Zellen ungetrocknet im Serum schwimmend beobachtet werden können.

6. Darstellung durch Supravitalfluorochromierung

Zur Darstellung der LE-Zellen sind bisher zwei Methoden bekannt: die fixierte Ausstrichtechnik auf Objektträgern mit verschiedenen Färbungen und die Supravitalfluorochromierung mit Akridin orange (39). Die Fixierung hat den Vorteil der Einfachheit und der Aufbewahrungsmöglichkeit. Die Vitalfluorochromierung erlaubt durch die ihr eigene hohe Transparenz eine erhebliche Präparatdicke und somit eine rasche Auswertung sowie

die Auszählung der LE-Zellen in großen Leukozytenaggregaten. Man kann mehrere 1000 Zellen durchmustern und damit Fehlresultate vermeiden, wie sie durch die fleckweise sehr unterschiedliche LE-Zellentstehung auftreten können. Als weiterer Vorteil dieser Methode ist die sichere Abgrenzung echter LE-Zellen von Pseudo-LE-Zellen anzusehen. Bei Verwendung von hochmolekularen Substanzen, wie hier Dextran als Sedimentationsbeschleuniger, sind Pseudo-LE-Zellen beschrieben worden (7, 16, 17, 19). INDERBITZIN (19) fand sie bei Verwendung von Liquoid Roche, Polyvinylsulfonsäure, PVAS, Dextran- und Chondroitinestern. Es kommt dabei zu allerlei Zelleinschlüssen, wie sie auch bei phagozytierten Leuko- und Erythrozyten, Amyloid und Pilzen, vornehmlich aus der Aspergillusgruppe vorkommen. Auch die bekannten A-B- und Tartzellen, die unspezifische Begleitreaktionen sind, geben bei dieser Methode keine Verwechslungsmöglichkeit, da die dunkelgrüne homogene Färbung nur den echten LE-Einschlüssen eigen ist. Wie schon erläutert, scheint diese Methode der Supravitalfluorochromierung unentbehrlich für die quantitative Arbeit am LE-Phänomen.

7. Einflüsse der Fluochrome und des UV-Lichts auf das LE-Phänomen

Es lagen sehr eingehende Untersuchungen über Farbstoffempfindlichkeit vitaler Zellen (6, 12, 23) und Strah-

lenschädigung durch UV-Licht vor. Vor allem KOSENOW hatte sich mit Vitalitätsprüfungen im Stärkeanlagerungsversuch und durch Messung der Auswanderung vitaler Leukozyten aus dem hängenden Tropfen befaßt (23). Er bringt in seiner Arbeit genaue Angaben der Überlebensdauer unter Fluoreszenzfarbstoffen und unter UV-Licht. Während die Lichtbelastung ausreichend genau meßbar ist, macht es Schwierigkeiten die Farbstoffbelastung der Einzelzelle zu messen. KOSENOW begnügte sich mit der Beschreibung des Farbeffektes an der Zelle. -

Da in einer Blutzellsuspension die Aufnahme des Farbstoffes von jeder Zellart verschieden ist und im Serum nur bei Überangebot des Farbstoffes eine Fluoreszenz sichtbar wird, wurden vergleichend verschiedene Blutzellen im Hinblick auf ihre Farbstoffaufnahme untersucht. Vollblut mit einer normalen Leukozytenzahl wurde mit einem Leukämieblut mit der 100 fachen Menge weißer Blutzellen bei gleicher Gesamtzellzahl verglichen. Die Leukozyten des Leukämieblutes waren wesentlich schwächer angefärbt als die wenigen im Normalblut. Daraus ergibt sich, daß die Farbstoffaufnahme der Erythrozyten im Vergleich zu Leukozyten nicht ins Gewicht fällt. Auch KOSENOW beschreibt diesen Effekt neben der Tatsache, daß Erythrozyten zwar Farbstoff aufnehmen, aber erst bei sehr hoher Konzentration im basischen ph-Bereich fluoreszieren. Dabei ist Ringer-, Tyrode- und physiologische Kochsalzlösung geeigneter als Phosphatpuffer zur Lösung

des Akridin orange, da es bei den ersteren zu höheren Farbstoffkonzentrationen in der Zelle kommt.

Tab. V

Farbst.Konzentration	1:40ooo	1:80ooo	1:120ooo	1:200ooo	Bemerkungen
Granulozyt.					
Kern	grün	hellgrün	blaßgrün	blaßgrün	
Granula	orange-rot	orange	blaß-orange	orange-gelb	
Kontur	scharf	scharf	unscharf	unscharf	Normalblut: Ges.Zellzahl: 4,26 Mi
Lymphozyt.					Leukozyt: 5.400/mm^2 = 1/1000 Leuko.
Kern	grün-leuchtd.	grün-leuchtd.	grün	mattgrün	
Granula	rot	rot	blaß-orange	blaß-orange	
Granulozyt.					
Kern	grün	blaßgrün	kaum angefärbt	kaum angefärbt	
Granula	orange-rot	blaßgelb	kaum angefärbt	kaum angefärbt	Leukämieblut: (Konzentrat)
Kontur	scharf	unscharf	unscharf	unscharf	Ges.Zellzahl: 4,1 Mil
Lymphozyt.					Leukozyt: 400.ooo/mm^2 = 1/10 Leuko.
Kern	grün-leuchtd.	blaßgrün	kaum gefärbt	kaum gefärbt	
Granula	rot	blaßgelb	nicht gefärbt	nicht gefärbt	

Zu Tab. V: Bei ausreichender Färbung sind Granulozytenkerne hellgrün und Granula orange, die Lymphozyten leuchtendgrün mit roten Granula. Konturen sind scharf. Die Färbung ist - abhängig von der Zellzahl - für das Normalblut bei 1 : 80 ooo Farbstoffverdünnung und für das Leukozytenkonzentrat bei 1 : 60.000 etwa optimal.

Schon aus dieser Tabelle geht hervor, daß Lymphozyten im Vergleich zu Granulozyten weniger Farbstoff brauchen, um eine leuchtende Fluoreszenz zu erreichen. Das bestätigte sich bei der Anfärbung zweier Leukozytenkonzentrate aus Blut von einer lymphatischen und einer myeloischen Leukämie.

Es müßte deshalb bei Fluoreszenzuntersuchungen am LE-Phänomen auf ein möglichst gleichmäßiges Leukozytenkonzentrat geachtet werden. Zellzahl und Vermischung mit Erythrozyten und Lymphozyten sollte bei einer Versuchsreihe konstant gehalten werden.

Wir fanden eine weitgehende Hemmung des LE-Phänomens durch Akridin orange. Die Phagozytose als zweiter Teil des LE-Phänomens ist demnach ein sehr empfindliches Vitalitätszeichen. KOSENOW beschreibt bei Konzentrationen um 1: 5ooo eine deutliche Einschränkung der Granulozytenphagozytose durch Akridin orange (23). Allerdings macht er keine Angabe über das Verhältnis der Zellzahl zur Farbstoffmenge. Es gibt einen recht schmalen Konzentrationsbereich, in dem noch ausreichende Anfärbung erreicht wird bei noch deutlicher

LE-Zellbildung. Das Absterben der Zelle ergibt sich aus Farbkonzentration und Einwirkungszeit. Nach einer Zeit von 90 bis 120 Minuten war keine gut gefärbte Zelle mehr phagozytierfähig. Man erreicht deshalb eine hohe Ausbeute an LE-Zellen nur bei unzureichender Färbung, muß also nachfärben, um ausreichende Differenzierung der LE-Zellen möglich zu machen. Bei einem Leukozytenkonzentrat von 100.ooo/mm^2 liegt die optimale Farblösung zwischen 1:60.ooo und 1:100.ooo (Tab.VI).

Tab. VI

Farbstoff-Konzentration	LE-Zellbildung	Färbung
1: 60 ooo	einzelne LE-Zellen	sehr starke Färbung, teilw.überfärbt, verz. tote Zellen
1: 80 ooo	einzelne LE-Zellen	Färbung gut, beste Kontraste
1: 100 ooo	reichlich LE-Zellen	Färbung noch genügend, schlechte Kontraste
1: 120 ooo	45 % LE-Zellen	Färbung nicht mehr ausreichend, Präparate mußten nachgefärbt werden, um eine klare Differenzierung zu ermöglichen.
1: 140 ooo	65 % LE-Zellen	
1: 160 ooo	65 % LE-Zellen	

Zellzahl 100 ooo/mm^2. Auch hier individuelle Unterschiede. Bei anderem Spenderblut gab es schon bei 1: 60 ooo gute LE-Zellbildung.

Erschwert werden diese Untersuchungen durch die ständig wechselnde Intensität der Strahlung des Akridin orange. Es hat nach den Beobachtungen von DE BRUYN (6) etwa 4 Stunden nach der Färbung seinen sogen. peak, d.h. die intensivste Strahlung, die langsam wieder abnimmt. Die Strahlungsintensität wird selbst durch kurzzeitige UV-Bestrahlung stark verändert. Bei der absterbenden Zelle finden sich wieder völlig andere Strahlungseffekte, wie sie von STRUGGER erstmalig beschrieben wurden (37). Die Plasmafluoreszenz zeigt einen Farbumschlag vom Grün der lebenden Zelle zum Rot bei der toten, den sogen. STRUGGER-Effekt (23).

Ein Versuch, den Angriffspunkt des LE-Faktors dadurch zu beurteilen, daß man nur Substrat- oder vitale Zellen dem gefärbten LE-Serum aussetzt - praktisch eine Fluochrommarkierung der mit LE-Faktor vorbehandelten Zellen - scheiterte an der raschen Farbstoffabgabe der Zellen unter Waschprozessen. Die Bindung des Akridin orange an die Zellbestandteile scheint leicht reversibel zu sein. Bereits nach der zweiten Wäsche im Serum war die Färbung nur noch blaß, und das Waschserum färbte seinerseits ungefärbte Zellen wieder an.

In Arbeiten von DE BRUYN, ROBERTSON und FARR (6, 12) war ein anderer Fluoreszenzfarbstoff als besonders unschädlich und von starker Affinität zum Kernmatieral beschrieben worden. Man hatte das 3,6 diamino-10-methylacridiniumchlorid Ratten in vivo injiziert und

nach Tagen die gefärbten Leukozyten auf ihre Vitalität in der hängenden Tropfenkultur untersucht. Sie waren ebenso vital wie die ungefärbten und hatten von ihrer Fluoreszenz nicht wesentlich eingebüßt.

Auch nach unseren Waschprozessen erwies sich dieser Farbstoff als wesentlich stabiler an das Kernmaterial gebunden. Für LE-Untersuchungen ist er wegen der fehlenden Metachromasie ungeeignet. Die blaßgrüne Fluoreszenz wird von allen Kernbestandteilen gleich stark abgegeben. Die homogenen Einschlüsse heben sich dadurch kaum vom Kern ab. Eine Plasmafluoreszenz fehlt wie auch die der Granula.

Ein weiteres Hindernis für Beobachtung vitaler Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ist ihre hohe Empfindlichkeit gegen UV-Licht. Schon nach wenigen Minuten sind die Zellen abgestorben und geben dann eine veränderte Fluoreszenz. Diese Tatsache macht zwar eine Unterscheidung der vitalen von avitalen Zellen möglich, verlangt aber bei der Auswertung der Präparate ein rasches Arbeiten. Überhaupt erfordert die Fluoreszenzzytologie Erfahrung mit den recht diffizieln Farbeffekten, die gerade das metachromatische Akridin orange unter den verschiedenen Bedingungen aufweist.

D Schlußfolgerungen

Nach den vorangegangenen Untersuchungen lassen sich die eingangs erwähnten Fragen im Hinblick auf optimale Bedingungen für die gesuchte Methode wie folgt beantworten:

1. Zur Substratgewinnung: Ergiebig, schonend und schnell genug war nur die Leukozytensedimentation mit Hilfe großmolekularer Substanzen als Sedimentationsbeschleuniger. Um unbekannte Einflüsse anderer pathologischer Vorgänge weitgehend auszuschalten, wurde nur Blut gesunder Spender verwendet. Deshalb war Leukämieblut oder eine hohe Blutsenkungsreaktion unbrauchbar. Häufiges Zentrifugieren und abpipettieren schädigt die Zellen zu sehr. Als unschädlich für das LE-Phänomen erwies sich 3 % Dextran als Sedimentationsbeschleuniger in Hankscher oder Tyrode-Lösung gelöst und im Verhältnis 1 : 4 Teilen Blut.

2. Zur Traumatisierung: Es wurden Gefrier-, Trockenverfahren und Ultraschallschädigung geprüft, weil bei den mechanischen Verfahren eine Zählung der alterierten Zellen bei kurzer Arbeitszeit unmöglich ist. Die zum Phagozytieren bestimmten Zellen sollen inzwischen vital bleiben und aus derselben Blutabnahme sein. Ultraschall ergibt zuviel Detritus bei überlebenden Zellen. Die besten Resultate hatten wir mit Trockenzellen.

3. Zur Inkubation wurden Zeit, Temperatur, geeignete Gefäße und Geräte geprüft. Die bekannten optimalen Bedingungen gaben auch hier die besten Werte: Raum- bis Körpertemperatur und Versuchszeit 90 - 120 Minuten. Zur Vermeidung von Zellverlusten erwiesen sich die Kunststoffe (PVC und Polyaethylen) durch ihre geringe Benetzbarkeit als unentbehrlich für Mikro-Methoden in der Zytologie.

4. Das LE-Serum muß je nach LE-Faktorgehalt in konstantem Verhältnis zur Zellzahl des Substrates allen Ansätzen gleich zugesetzt werden. Zu geringer LE-Faktorgehalt ergibt wenig LE-Zellen. Wenn LE-Serum tiefgekühlt (-20°) aufbewahrt wird, kann es nach 15 Monaten noch wie frisches verwendet werden mit besten Resultaten.

5. Antikoagulantienzusätze: Es wurden Heparin, Tetracemin und Citrat zur Gerinnungshemmung verwendet und mit durch Rühren defibriniertem Blut verglichen. In üblicher Dosierung erwies sich nur Tetracemin als hemmend auf das LE-Phänomen. Während niedrige Dosen Heparin günstig für die LE-Zellbildung sind, stören hohe Dosen den empfindlichen Vorgang. Hier fand sich, daß individuelle Unterschiede gegeben sind (siehe Abb. 2 und 3).
Ob die unterschiedliche Wirkung des Heparin als Folge der von STÜTTGEN u.a. (38) beobachteten

Proteolyse durch Heparin aufzufassen ist, kann nur vermutet werden.

6. Zur Darstellung durch Supravitalfluorochromierung fand sich, daß dieser Nachweis der alten Ausstrichtechnik weit überlegen ist. Ihre Vorteile sind: die Möglichkeit, das gesamte inkubierte Zellmaterial durchzumustern und die bessere Differenzierung von Pseudo-LE-Zellen durch die metachromatischen Kontraste der Zellbestandteile wie auch die Schichtdicke der Präparate, die die großen vulnerablen LE-Zellen und Rosetten besser schont.

7. Einflüsse der Fluochrome und des UV-Lichtes auf das LE-Phänomen: Die Fluochrommarkierung von Leukozyten zur Beobachtung des LE-Phänomens erwies sich als unmöglich, denn die Fluoreszenzfarbstoffe (Akridin orange und 3,6 diamino-10-methylacridiniumchlorid) erwiesen sich als ungeeignet. Das erste haftet nur lose an der Zelle, so daß zugegebene ungefärbte Zellen sofort bis zur Farbgleichheit angefärbt werden, das zweite ergibt bei besserer Zellhaftung keinen metachromatischen Effekt, der zur LE-Zelldifferenzierung Voraussetzung ist. Die Farbstoffe stören zudem das LE-Phänomen in zur Färbung ausreichender Konzentration. Bei geringer Konzentration läuft das LE-Phänomen zwar ab, muß aber nachgefärbt werden. Noch schädlicher ist das UV-Licht; bestrahlte Zellen ergeben keine LE-Zellbildung.

Eine quantitative Auswertung des LE-Phänomens ist bei Berücksichtigung der oben beschriebenen optimalen Bedingungen möglich, wie sich an den Untersuchungen mit steigenden Heparindosen bei verschiedenem Spenderblut beweisen ließ (siehe Abb. 2 und 3). Es fanden sich meist anfangs etwas ansteigende, später abfallende Kurven der LE-Zellbildung, die bei gleichem Spender gleichlaufend waren.

III. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über eine Methode der quantitativen Erfassung des LE-Zellphänomens berichtet, die durch sichere Differenzierung und Erfassung aller Substratzellen weitgehende Genauigkeit und Aussagekraft für Untersuchungen am LE-Phänomen gewährleisten soll.

Dafür wurden bisher bekannte Methoden mit neuen Versuchsbedingungen verglichen und die geeignetsten ausgewählt.

Die Auswahl erfolgte im Hinblick auf exakte Versuchsbedingungen und Reproduzierbarkeit bei weitmöglichem Ausschluß unbekannter Faktoren und hemmender Einflüsse auf das LE-Phänomen.

Zur Gewinnung des Leukozytenkonzentrates wurden Metho-

den diskutiert, Lösungsmittel und Ungerinnbarmachung sowie Zusätze wie Sedimentationsbeschleuniger und Antikoagulantien vergleichend untersucht.
Es wurden Traumatisierungsmethoden für Leukozyten wie Einfrieren, Trocknen, Waschungen, mechanische Lädierung durch Schütteln mit Glasperlen, Zerreiben des geronnenen Blutkuchens, Alterung und Ultraschallanwendung nach der Möglichkeit der Zellzählung ausgewählt.
Zur Inkubation mit LE-Serum wurde Serumalter und -konzentration, Inkubationszeit und -temperatur sowie Substratgefäße und Mischungsverhältnisse geprüft.
Besonderes Interesse galt den Antikoagulantien: Heparin, Zitrat und Tetracemin im Vergleich mit durch Rühren defibriniertem Blut, wobei sich Tetracemin (EDTA) und große Dosen Heparin als hemmend auf das LE-Phänomen erwiesen.

Weiter wurden die Vorteile der Darstellung durch Supravitalfluorochromierung gegenüber der viel geübten Ausstrichtechnik diskutiert.

Für Beobachtungen am LE-Phänomen ist die Supravitalfluorochromierung ungeeignet, da die Fluochrome in geeigneter Konzentration und das UV-Licht das LE-Phänomen hemmen. Literatur und eigene Versuche wurden diskutiert.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ALEXANDER, M. und W. ROTHENBERGER — Zur Diagnostik des Erythematodes disseminatus. Med. Klinik 59 (1964) 205-209

2. BAEHR, G. und P. KLEMPERER — Systemic Lupus Erythematosus. Grune and Stratton, New York/London 1959.

3. BEICKERT, A. — Das Lupus Erythematodes-Phänomen und die antinukleären Faktoren. Jena, Fischer, 1963.

4. BRICHTA, G., F. EGGHART u. G. WIEDEMANN — Das LE-Phänomen und die Möglichkeiten seines Nachweises. Wiener Zschr.f.Inn.Med. 38 1957, S. 477-484.

5. BURKHARD, P. — Vergleich morphologischer und serologischer Kriterien bei der Diagnostik des visceralen Erythematodes. Blut 5, 1959, S. 2o9-220.

6. DE BRUYN, P., G. ROBERTSON u. R.S. FARR — "Invivo Affiniti of diaminoacridine for nuclei" Anat. Records 1o8 (195o) S. 279-308.

7. DUBOIS, E.L. — "Lupus Erythematosus" Mc. Graw Hill Book Comp. 1954.

8. DERSELBE — Systemic LE. Recent advances in its Diagnosis and Treatment. Anals of Intern Med. Vol. 45 (1956), S. 163-184.

9. DERSELBE — Effect of Quinacrine upon LE-Phenomenon. Arch.Dermat.Syph. 71 (1959), S. 570-574.

10. DUBOIS, E.L. u. V. FREEMAN — A comparative evaluation of the sensivity of the LE-cell test ... Blood 12 (1957), S. 657.

11. EPPES, W. u. E. LUDOWIC — Demonstration of the LE-cell without use of antikoagulants. Blood 6 (1951) S. 466-469.

12. FARR, R.S. — Rate of lymphocytes Anat.Records 109 (1951) S. 513-534.

13. GÖTT, E. — Beteiligung der Monozyten und Lymphozyten am LE-Phänomen Acta haemat. 29 (1963). S. 27-36.

14. GONYA, L.M., R.A. KALLSEN u. A.A. MARLOW — The occurance of the LE-cell in clotted blood. J.invest.Dermat. 15 (1950) S. 11-12.

15. GRIBETZ, D. u. W.L. HENLEY — Syst. LE in childhood in "Baehr a. Klemperer, Grune a. Stratton" s. Nr. 2, S. 65-73.

16. HARGRAVES, M.M. — The LE Zell-Phenomenon Advances i.Intern.Med. 6 (1954) S. 133-160.

17. HASERICK, J.R. — Simulation of the LE phenomenon by materials of fungal origin. J.Invest. Dermat. 16 (1951). S. 211-215.

18. DERSELBE u. L.A. LEWIS — Blood factor in acute diss. LE Arch.Dermat.Syph. 61 (1950), S. 889-891.

19. INDERBITZIN, Th. — Experimental production of leucocytic changes ... similar to LE cells ... J. Invest. Dermat. 20 (1953) S. 67-79.

20. DERSELBE u. M. HUNZIKER — Zur Frage der Spezifität des LE-Zellphänomens Dermatologika 113 (1956) S. 375-389.

21. JARCHOW, S. — The Clinical Features of Syst. LE in: Baehr u. Klemperer siehe Nr. 2. S. 54-65.

22. KLIMA, et al. — Leukocatenkonzentrate Wien. Med. Wschr. 106 (1956). S. 809-811.

23. KOSENOW, W. — Lebende Blutzellen im Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskop Basel, Karger 1956.

24. LEE, S.L. u. B.J. DAVIS — The blood in Syst. LE in: Baehr u. Klemperer siehe Nr. 2, S. 37-54.

25. LEE, S.L. — Inhibition of Leukocyte agglutination by Serum of pat. with SLE. Blood 13 (1958). S. 778-788.

26. DERSELBE — The LE-cell Clinical and chemical Studies. Amer. J. Med. 10 (1951). 446-451.

27. LOCHTE, FERRBEE, THOMAS u. COOPERSTOWN — The effect of Heparin and EDTA on DNA Synthesis by Marrow i. vitro. J. Laborat. Clin. Med. 55 (1960). S. 435-438.

28. MARMONT, A., M.A. PIUMA u. G. CAPONI
Eine einfache Methode zur Auslösung des LE-Phänomens durch mechanische Schädigung der Leukozyten des Substrats.
Schweiz.Med.Wschr. 87 (1957) S. 1253-57.

29. MATHIS, H.B.
A simple office procedur for demonstrating LE-cells in peripheral blood
Blood 6 (1951) S. 470-73.

30. MINOR, A.H. u. L. BURNETT
A method for isolating polymorphonuclear Leukocytes from peripheral blood
Blood 4 (1959), S. 667-669.

31. MOYER, J.B., G.S. FISHER
Experimental production of LE-cells
Amerik.J. Clin.Path. 20 (1950) S. 1011-1015.

32. POLLACK, A.D.
Some observations on the pathologie of Syst. LE.
in: Baehr u. Klemperer siehe Nr. s, S. 1 ff.

33. RIFKIND, R.A. u. G.L. GOODMAN
Phasecontrast interferometric mikroskopie of the LE-phenomenon
J. Exper.Med. 106 (1957). S. 607-616.

34. ROHN, R.J. u. W.H. BOND
The dynamics of LE-cells supravitally stained
J. Laborat.clin.Med. 38 (1951). S. 944-954.

35. SNAPPER, I. u. D.J. NATHAN
Formation of large number of "lupus-cells" ...
Blood 10 (1955) S. 718-729.

36. VAN SOEREN, F.
Simple determination of the LE factor
Ann. Rheumat.Dis. 20 (1961). S. 281-289.

37. STRUGGER, S.
Fluorescenzmikroskopie und Mikrobiologie
Hann. Schaper 1949
S. 52.

38. STÜTTGEN, G., N. HOFFMANN u. W. SIMMICH
Die Aktivierung der Proteolyse des menschlichen Serums und der Haut durch Heparine
Klin. Wschr. (1957)
S. 1168-71.

39. THOM, R. u. M. ALEXANDER u. G. SCHEIB
Fluorescenzmikroskopischer Nachweis von LE-Zellen.
Verh.dtsch.Ges.Inn.Med.
70. Kongreß (1964)
S. 213-217.

40. WATSON, J.B., O'LEARY u. M.M. HARGRAVES
Neutrophiles resembling LE-cells in arteficial blisters.
Arch. Dermat. Syph. 63 (1951)
S. 2328-332.

41. WEINGARTEN, K. u. H. BRAUNSTEINER
Der LE in neurologischer Sicht
Wiener Klin.Wschr. 74 (1962)
S. 709-713.

42. ZIMMER, F.E. u. M.M. HARGRAVES
The effect of blood coagulation on LE-cell formation.
Proc. Staff. Meet. Mayo Clin. 27 (1952) S. 424.

43. ZINKHAM, W.H. u. C.L. CONLEY
Some factors influencing the formation of LE-cells
Bull. Johns Hopkins Hosp. 98 (1956) S. 102.

An dieser Stelle möchte ich Frau Professor Dr. med. M. Alexander meinen aufrichtigen Dank sagen für die Anregungen und Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. H. R. Thom gilt mein Dank für die Betreuung und Anleitung bei der praktischen Arbeit im Labor und die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Lebenslauf

Als Tochter des Arztes Dr.med. Hans Fuchs und seiner Ehefrau Hildegard wurde ich am 2.12.22 in Berlin geboren. Meine Schulausbildung erhielt ich bis zur Reifeprüfung an der Staatlichen Gertrauden-Schule Berlin-Dahlem.

Durch Kriegsverpflichtung und Krankheit wurde meine Ausbildung unterbrochen. Nach meiner Eheschließung 1947 arbeitete ich nur zeitweise beruflich.

Mein Medizinstudium absolvierte ich an der Freien Universität Berlin vom Herbst 1957 bis zum Staatsexamen im März 1964.

Die Tätigkeit als Medizinalassistentin führte mich zunächst vier Monate in die Psychiatrie in der Waldhaus-Klinik, dann vier Monate in die Gynäkologie und Geburtshilfe im Hubertus-Krankenhaus Schlachtensee und fünf Monate in die Chirurgische Abteilung desselben Hauses. Weitere sechs Monate arbeitete ich an der Ersten Medizinischen Universitäts-Klinik im Westend-Krankenhaus und fünf Monate im Kinderkrankenhaus Wedding.

Meine Approbation erhielt ich zum 15.12.1966.
Im Januar 1967 begann ich meine Facharztausbildung an der Neuropsychiatrischen Klinik Waldhaus Berlin-Nikolassee.